

徐岩, 潘红平, 阎冰, 等. 基于线粒体 COI 和 16S rRNA 基因的中国沿海相手蟹系统发育研究[J]. 海洋学报, 2019, 41(8): 63–71, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2019.08.006

Xu Yan, Pan Hongping, Yan Bing, et al. Molecular phylogeny of the sesarimid crab based on the partial sequences of mitochondrial COI and 16S rRNA genes from the coast of China[J]. Haiyang Xuebao, 2019, 41(8): 63–71, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2019.08.006

基于线粒体 COI 和 16S rRNA 基因的中国沿海 相手蟹系统发育研究

徐岩^{1,2}, 潘红平¹, 阎冰², 高霆炜², 吴斌², 杨明柳^{2*}

(1. 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西科学院 广西红树林研究中心 广西红树林保护与利用重点实验室, 广西北海 536000)

摘要: 相手蟹科的诸多种类因其形态极其相似成为方蟹总科分类中疑问较多的一个类群。通过对中国沿海相手蟹线粒体 COI 和 16S rRNA 基因序列进行分子系统发育分析, 结果表明 14 种相手蟹 COI 和 16S rRNA 基因序列之间差异分别为 5.7%~14.5% 和 1.5%~12.1%, 均达到了种间差异水平。构建的系统发育树显示, 14 种相手蟹分别为独立有效物种, 但分属于拟相手蟹属和近相手蟹属的 4 种拟相手蟹和 3 种近相手蟹, 没有分别形成 2 个独立的支系, 而是混合聚成一大支系。而属于螳臂相手蟹属的无齿螳臂相手蟹则首先与属于中相手蟹属的中华中相手蟹聚成一支, 再与红螯螳臂相手蟹聚为一大支, 表现出与形态分类的不一致。错综复杂的分子系统关系预示着相手蟹类为多系起源, 也表明它们之间的种间关系乃至于属间关系尚有诸多问题有待进一步厘定。

关键词: 相手蟹; 线粒体 DNA; COI 基因; 16S rRNA 基因; 系统发育

中图分类号: Q959.223

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2019)08-0063-09

1 引言

相手蟹隶属于方蟹总科 (Grapsoidea), 相手蟹科 (Sesarimidae), 种类繁多, 多数生活于红树林生态系统中^[1-2]。中国记录的相手蟹有 37 种, 隶属于 16 个属^[3]; 杨明柳等^[4-5]、梁晓莉^[6] 分别于 2014 年、2016 年、2017 年报道了分布于北部湾、海南三亚和长江河口的 3 种相手蟹: 即 *Perisesarma eumolpe*、*Parasesarma unguatum* 和隐秘螳臂相手蟹 (*Chiromantes neglectum*)。

由于线粒体 DNA 具有分子量小、结构简单、进化速度快、母性遗传等特点^[7], 已成为研究动物群体遗传分化、分类及系统发育的理想分子标记。在线粒体基因组中, 线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基 (COI)

基因属于变异性较大的区域, 适合于种间区分和种内的分子系统学研究; 16S rRNA 基因相对保守, 适合于远缘物种研究^[8]。已有较多利用 COI 和 16S rRNA 基因序列来进行相手蟹等蟹类分子系统学的研究^[9-13]。

尽管已有一些针对相手蟹的分类学研究^[14-18], 但因早期研究者对一些新种或新记录的描述不够详细, 或者因一些模式标本的缺失, 致使出现同物异名或异物同名等分类混乱现象, 加之对一些种类缺少了解, 因此, 相手蟹科的分类尚存在较多疑问。

首先对 2004 年 6 月至 2013 年 6 月采集的中国沿海相手蟹进行形态分类; 在此基础上, 运用线粒体 DNA 的 COI 和 16S rRNA 基因片段对其进行种间和种内序列分析并构建系统发育树, 探讨其属间、种间

收稿日期: 2019-04-01; 修订日期: 2019-06-13。

基金项目: 国家重点研发计划科技基础资源调查专项 (2017FY100704); 广西自然科学基金项目 (2017GXNSFBA198163)。

作者简介: 徐岩 (1992—), 男, 山东省日照市人, 主要从事动物资源保护研究。E-mail: mangrovexuyan@126.com

* 通信作者: 杨明柳, 助理研究员, 主要从事海洋生物研究, E-mail: yangmingliu2010@163.com

和种内的分子系统关系,以期利用分子生物学手段,解决相手蟹科蟹类存在的分类疑问,为其分属及种类厘定提供基础资料。

2 材料与方法

2.1 材料

研究用的 14 种相手蟹和外群弧边招潮的相关信息见表 1,所有样品均浸泡于 95% 酒精中保存,所有样品均保存在广西红树林保护与利用重点实验室。

2.2 方法

取约 20 mg 步足肌肉用基因组 DNA 提取试剂盒 (OMEGA 公司) 进行提取,提取的 DNA 保存于 -20°C 。分别以 COIL1490: 5'-GGTCAACAAAT-CATAAAGATATTGG-3', COIH2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' 和 16Sar: 5'-CGCCTGTTTAAACAAAACAT-3', 16Sbr: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCA CGT-3' 为引物扩增 COI^[19] 和 16S rRNA^[20] 基因片段。PCR 扩增反应体积为 50 μL , 其中 *Taq102* \times MasterMix (北京奥赛博公司) 19 μL , 模板 DNA 2 μL , 引物各 2 μL , Milli-Q-Water 补足至 50 μL 。

COI 基因片段 PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min

后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 35 次, 然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 16S rRNA 基因片段反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1.5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 39 个循环, 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色检测, 样品送至广州英潍捷基测序公司进行纯化, 并用 ABI 3730XL 测序仪进行正反链双向测序。

序列由 DNASTAR 软件包的 SeqMan、MegAlign 和 EditSeq 程序进行编辑、校对和排序; DNAsp5.0 检测多态位点数、简约信息位点数。采用 Mega4.0 软件计算遗传距离。使用最大似然法和贝叶斯两种分析方法重建系统发育树: 利用 RAxML v 8.0.0 软件对矩阵进行最大似然法分析建树。用 100 次重复的自展分析来评估树图拓扑结构的可靠性。所有运算都是在 CIPRES 网站完成^[21]。通过 MrModeltest 筛选出 COI 和 16S rRNA 的最佳替换模型分别为 GTR+I+G 和 GTR+I, 利用 MrBayes v3.0b4 软件包^[22] 进行贝叶斯法分析建树, 采用马尔科夫链的蒙特卡洛 (Markov Chain Monte Carlo) 方法, 以随机树为起始树, 运行 1 000 000, 每 1 000 代取样 1 次, 每次运算开始的 250 个样本作为老化样本舍弃, 最后获得各分支

表 1 测序用 14 种相手蟹及外群弧边招潮取样信息

Tab. 1 The information of 14 Sesarmidae species and outgroup *Uca arcuata*

代码	种类	采集地点	样本量/只	采样时间
Pa	近亲拟相手蟹 <i>Parasesarma affine</i>	北海高德镇草头村 21°33'38.7"N, 109°09'21.8"E	3	2012年7月
Pp	斑点拟相手蟹 <i>Parasesarma pictum</i>	汕头澳头苏埃湾红树林 23°19'29.3"N, 116°42'58.3"E	1	2013年6月
Pt	三栉拟相手蟹 <i>Parasesarma tripectinis</i>	雷州企水海角村 20°48'13.2"N, 109°44'9.7"E	2	2012年10月
Pu	<i>Parasesarma unguatum</i>	海南三亚青梅港 18°13'27.3"N, 109°37'7.0"E	9	2012年10月
Pb	双齿近相手蟹 <i>Perisesarma bidens</i>	北海高德镇草头村 21°33'38.7"N, 109°09'21.8"E	3	2012年7月
Pe	<i>Perisesarma eumolpe</i>	海南洋浦 19°46'8.8"N, 109°15'15.0"E	1	2012年10月
Pm	米埔近相手蟹 <i>Perisesarma maipoensis</i>	海南洋浦 19°46'8.8"N, 109°15'15.0"E	3	2012年10月
Ev	泡粒上相手蟹 <i>Episesarma versicolor</i>	海南东寨港 19°58'34.2"N, 110°33'34.4"E	3	2012年10月
Nm	小相手蟹 <i>Nanosesarma minutum</i>	汕头澳头苏埃湾红树林 23°19'29.3"N, 116°42'58.3"E	2	2013年6月
Ss	中华相手蟹 <i>Sesarmops sinensis</i>	深圳福田红树林 22°31'13.6"N, 114°01'32.9"E	3	2013年6月
Cd	无齿螳臂相手蟹 <i>Chiromantes dehaani</i>	珠海淇澳红树林 22°23'45.4"N, 113°38'37.8"E	1	2013年6月
Ch	红螯螳臂相手蟹 <i>Chiromantes haematocheir</i>	山东日照两城东南村 35°33'34.48"N, 119°37'51.0"E	2	2004年6月
Sg	吉氏胀蟹 <i>Sarmatium germaini</i>	海南东寨港 19°58'34.2"N, 110°33'34.4"E	6	2012年10月
Cs	中华泥毛蟹 <i>Clistocoeloma sinense</i>	龙海市紫泥镇金定村 24°28'6.4"N, 117°54'19.5"E	1	2012年9月
Ua	弧边招潮 <i>Uca arcuata</i>	阳江市阳西县程村镇 21°46'12.4"N, 111°44'49.8"E	1	2013年6月

的后验概率。

3 结果

3.1 基因序列及变异

对 14 种相手蟹 40 个样本及外群 1 个样本共计 41 个个体的线粒体 COI 基因片段进行 PCR 扩增和序

列测定, 所有序列长度均为 631 bp, 其中三栉拟相手蟹、*P. unguatum*、双齿近相手蟹、小相手蟹、中华中相手蟹、无齿螳臂相手蟹和吉氏胀蟹分别出现了 2、4、2、2、2、3 和 4 个单倍型(表 2)。

对 10 种相手蟹 25 个样本及外群 1 个样本共计 26 个个体的线粒体 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩

表 2 14 种相手蟹和外群弧边招潮 COI 和 16S rRNA 基因信息

Tab. 2 The COI gene and 16S rRNA gene information of 14 Sesarimidae species and outgroup *U. arcuata*

种类	单倍型 (COI/16S rRNA)代码	碱基含量/% (COI/16S rRNA)					序列长度/bp (COI/16S rRNA)	基因库登录号 (COI/16S rRNA)
		A	T	G	C	A+T		
近亲拟相手蟹 <i>P. affine</i>	Pa/Pa	29.0/37.1	36.9/39.2	17.1/15.0	17.0/8.7	65.9/76.3	631/507	MK611589/KU052882 ^[5]
斑点拟相手蟹 <i>P. pictum</i>	Pp/Pp	29.5/37.2	38.0/38.7	17.4/15.7	15.1/8.4	67.5/75.9	631/511	MK611594/KU052884 ^[5]
三栉拟相手蟹 <i>P. tripectinis</i>	Pt1/Pt	30.1/37.3	38.2/38.1	16.3/15.8	15.4/8.8	68.3/75.4	631/520	MK611595/KU052885 ^[5]
	Pt2	30.0	38.2	16.5	15.3	68.2		MK611596
<i>P. unguatum</i>	Pu1/Pu	29.2/36.6	38.4/38.9	16.5/15.8	15.9/8.7	67.6/75.5	631/517	MK611597/KU052886 ^[5]
	Pu2	29.2	38.5	16.5	15.8	67.7		MK611598
	Pu3	29.0	38.4	16.6	16.0	67.4		MK611599
	Pu4	29.2	38.2	16.5	16.1	67.4		MK611600
双齿近相手蟹 <i>P. bidens</i>	Pb1/Pb	28.8/37.4	38.2/39.0	17.3/15.3	15.7/8.3	67.0/76.4	631/497	MK611590/MK967687
	Pb2	28.8	38.4	17.1	15.7	67.2		MK611591
<i>P. eumolpe</i>	Pe/Pe	28.5/36.8	39.0/38.4	17.3/16.2	15.2/8.6	67.5/75.2	631/513	MK611592/MK967688
米埔近相手蟹 <i>P. maipoensis</i>	Pm/Pm	28.7/37.4	37.9/38.9	16.6/14.6	16.8/9.1	66.6/76.3	631/519	MK611593/MK967689
泡粒上相手蟹 <i>E. versicolor</i>	Ev/Ev	28.7/35.2	38.8/38.9	16.6/16.4	15.9/9.5	67.5/74.1	631/512	MK611586/MK967685
小相手蟹 <i>N. minutum</i>	Nm1/Nm	30.9/37.9	37.2/39.2	16.2/14.8	15.7/8.1	68.1/77.1	631/494	MK611587/MK967686
	Nm2	30.9	37.2	16.2	15.7	68.1		MK611588
中华中相手蟹 <i>S. sinensis</i>	Ss1/Ss	31.4/36.6	37.3/38.6	16.2/16.1	15.1/8.7	68.7/75.2	631/508	MK611605/MK967691
	Ss2	31.4	37.2	16.2	15.2	68.6		MK611606
无齿螳臂相手蟹 <i>C. dehaani</i>	Cd1/Cd	30.3/36.6	37.1/38.9	16.9/16.0	15.7/8.5	67.4/75.5	631/506	MK611581/MK967682
	Cd2	30.4	37.1	16.8	15.7	67.5		MK611582
	Cd3	30.4	36.8	16.8	16.0	67.2		MK611583
红螯螳臂相手蟹 <i>C. haematocheir</i>	Ch/Ch	30.0/37.2	38.2/38.8	16.3/15.5	15.5/8.5	68.2/76.0	631/505	MK611584/MK967683
吉氏胀蟹 <i>S. germaini</i>	Sg1/Sg	29.8/35.1	38.8/39.4	15.5/16.7	15.9/8.8	68.6/74.5	631/513	MK611601/MK967690
	Sg2	30.0	38.7	15.5	15.8	68.7		MK611602
	Sg3	29.5	37.2	16.3	17.0	66.7		MK611603
	Sg4	29.5	37.4	16.3	16.8	66.9		MK611604
中华泥毛蟹 <i>C. sinense</i>	Cs/Cs	29.3/36.4	37.1/39.0	16.6/15.2	17.0/9.4	66.4/75.4	631/500	MK611585/MK967684
平均		29.7/36.8	37.9/38.9	16.5/15.6	15.9/8.7	67.6/75.7	631/509	
弧边招潮 <i>U. arcuata</i>	Ua/Ua	29.2/34.7	32.2/37.1	17.1/18.5	21.5/9.7	61.4/71.8	631/493	MK611607/MK967692

增和序列测定, 序列长度为 494~519 bp, 每种相手蟹只有 1 个单倍型(表 2)。

由表 2 可见, 14 种相手蟹的 A、T、G、C 含量只有略微的差异, 表现出与其他蟹类 COI 和 16S rRNA 基因相同的特点^[10, 23-24], 即 A+T 含量(平均 67.6%/75.7%)明显高于 G+C 含量。本研究 14 种相手蟹的 COI 和 16S rRNA 基因序列比对分别获得 631 bp(无插入/缺失位点)和 509 bp(含插入/缺失位点)的同源序列, 二者共分别检测到 196 和 107 个变异位点, 其中简约信息位点分别为 165 个和 67 个。

3.2 种间和种内遗传差异

利用木村(Kimura)-双参数法计算得到了 14 种相手蟹种间和种内的遗传差异, COI 基因的遗传距离如表 3 所示, 相手蟹种类之间序列差异为 5.7%~14.5%, 种内之间序列差异为 0.2%~3.1%。而相手蟹 16S rRNA 基因种类之间的序列差异为 1.5%~12.1%。

3.3 分子系统发育

以弧边招潮(Ua)为外群, 基于 14 种相手蟹和 *C. neglectum*(代码: Cn; 基因库登录号: KX156954)^[25] 的 COI 和 16S rRNA 基因片段序列, 构建 BI 树和 ML 树, 它们的拓扑结构基本一致(图 1, 图 2), 14 种相手蟹(含 *C. neglectum*)可分为两大分支, 其中无齿螳臂相手蟹、*C. neglectum*、中华相手蟹和红螯螳臂相手蟹聚为一大支; 另一大支中 4 种拟相手蟹和 3 种近相手蟹聚成一支, 泡粒上相手蟹和中华泥毛蟹聚成一支, 吉氏胀蟹单独成支。

4 讨论

4.1 种内分化分析

在 14 种相手蟹中, 三栉拟相手蟹、*P. unguatum*、双齿近相手蟹、小相手蟹、中华相手蟹和无齿螳臂相手蟹种内 COI 基因单倍型之间序列差异为 0.2%~0.6%(表 3), 这与厚蟹种内 0.15%~1.22% 的变异度一致^[24]; 但吉氏胀蟹的 4 个单倍型分化出来了 Sg1/Sg2 和 Sg3/Sg4 两个组群, 两个组群内的遗传变异度均为 0.2%, 但两个组群间的遗传变异度则达到了 2.8%~3.1%(表 3), 表明组群间出现了较大的遗传分化, 这可能与滩涂型蟹类扩散能力强有关, 但具体原因有待对不同群体进行更深入的研究来揭示。而 10 种相手蟹的 16S rRNA 基因片段, 尽管有些种类含有多个样本, 但也只有 1 个单倍型; 表明该基因较前者相对保守, 进化速率相对较慢。

4.2 种间关系分析

本研究的 14 种相手蟹 COI 基因序列之间差异为 5.7%~14.5%, 一般认为 COI 基因序列的变异速率是 16S rRNA 基因的 2 倍以上^[9], 若依据 16S rRNA 基因的 1.5% 的种间差异标准^[26]; 这 14 种相手蟹的序列差异均达到了种间差异, 分子数据支持这 14 种相手蟹分别作为独立物种; 同基于 16S rRNA 针对拟相手蟹的研究结果^[5] 一样, 亦支持 *P. unguatum* 为有效种。相手蟹 16S rRNA 基因种类之间的序列差异为 1.5%~12.1%, 也支持其分别为独立物种。

值得注意的是, 本研究无齿螳臂相手蟹(*C. dehaani*)与均产于上海长江口的 *C. neglectum*^[25] 和无齿螳臂相手蟹(基因库登录号: MH593563)^[27] COI/16S rRNA 基因的 631 bp/506 bp 同源序列比对结果显示, 二者之间的序列差异分别为 0.32%/0.00%、1.42%/0.02%, 都属于种内差异范围; 即便是均产于上海长江口的无齿螳臂相手蟹^[27] 与 *C. neglectum*^[25] COI 和 16S rRNA 基因的全序列比对结果显示, 前者序列均为 1 535 bp, 序列差异仅为 0.65%; 而后者除 2 bp 插入/缺失外的 1 338 bp 同源序列, 序列差异仅为 0.30%, 也均显示二者属于种内差异范围。系统发育树亦显示无齿螳臂相手蟹(Cd)和 *C. neglectum*(Cn)以很高的置信度首先聚成一支(图 1, 图 2)。

但是, 梁晓莉^[6]通过对长江口(上海)无齿螳臂相手蟹的形态和 COI 基因部分序列的研究, 认为长江口的无齿螳臂相手蟹为错误鉴定, 拟改名为隐秘螳臂相手蟹; 需要注意的是, 该研究中利用 COI 基因部分序列进行分子系统分析所用的无齿螳臂相手蟹(基因库登录号: AB457708)标本来自日本^[28], 该标本 498 bp 的 COI 序列分别与无齿螳臂相手蟹^[27] 和 *C. neglectum*^[25] COI 基因的全序列比对结果显示, 498 bp 的同源序列均只有 2 bp(0.40%) 的差异, 表明三者属于种内差异范围; 在梁晓莉^[6] 基于部分 COI 基因序列的分子系统研究中, 长江口的无齿螳臂相手蟹和日本的无齿螳臂相手蟹之所以序列差异较大, 形成两个独立分支, 源于使用了非同源序列。

鉴于此, 尽管长江口的无齿螳臂相手蟹^[6] 与日本的无齿螳臂相手蟹^[29] 在形态上存在一定的差异, 但现有的分子数据表明, 无论是均产于上海长江口的无齿螳臂相手蟹^[27] 和 *C. neglectum*^[25], 还是本研究来自珠海的无齿螳臂相手蟹和前二者, 以及来自日本的无齿螳臂相手蟹^[28] 和前三者, 其遗传差异均属于种内差异范围, 揭示 *C. dehaani* 和 *C. neglectum* 为同一物种, 不支持将长江口的无齿螳臂相手蟹改为隐秘螳臂

表3 14种相手蟹COI基因种间和种内的遗传距离
 Tab. 3 Interspecific and intraspecific genetic distances of COI gene among 14 Sesamidae species

	Cd1	Cd2	Cd3	Ch	Cs	Ev	Nm1	Nm2	Pa	Pb1	Pb2	Pe	Pm	Pp	Pt1	Pt2	Pu1	Pu2	Pu3	Pu4	Sg1	Sg2	Sg3	Sg4	Ss1	Ss2	
Cdl																											
Cd2	0.002																										
Cd3	0.005	0.003																									
Ch	0.081	0.079	0.083																								
Cs	0.121	0.119	0.123	0.106																							
Ev	0.113	0.111	0.111	0.115	0.102																						
Nm1	0.113	0.111	0.115	0.109	0.118	0.137																					
Nm2	0.115	0.113	0.117	0.111	0.117	0.137	0.003																				
Pa	0.143	0.141	0.145	0.122	0.134	0.132	0.127	0.127																			
Pb1	0.124	0.122	0.126	0.122	0.134	0.135	0.123	0.123	0.094																		
Pb2	0.124	0.122	0.126	0.122	0.132	0.134	0.123	0.123	0.094	0.002																	
Pe	0.130	0.128	0.132	0.111	0.132	0.134	0.102	0.102	0.104	0.073	0.072																
Pm	0.119	0.117	0.117	0.122	0.128	0.107	0.126	0.128	0.114	0.117	0.117	0.097															
Pp	0.119	0.117	0.121	0.110	0.123	0.113	0.126	0.125	0.113	0.108	0.108	0.106	0.108														
Pt1	0.109	0.107	0.111	0.098	0.117	0.105	0.119	0.117	0.110	0.100	0.100	0.102	0.098	0.057													
Pt2	0.107	0.105	0.109	0.100	0.119	0.107	0.117	0.115	0.111	0.102	0.102	0.104	0.100	0.058	0.002												
Pu1	0.104	0.102	0.106	0.106	0.122	0.120	0.104	0.104	0.099	0.086	0.086	0.090	0.101	0.100	0.097	0.099											
Pu2	0.102	0.100	0.104	0.107	0.120	0.119	0.106	0.106	0.098	0.084	0.084	0.088	0.099	0.099	0.095	0.097	0.002										
Pu3	0.100	0.098	0.102	0.106	0.122	0.120	0.106	0.106	0.098	0.082	0.082	0.090	0.101	0.100	0.097	0.099	0.005	0.006									
Pu4	0.106	0.104	0.107	0.107	0.124	0.122	0.106	0.106	0.099	0.088	0.088	0.092	0.101	0.102	0.099	0.100	0.002	0.003	0.006								
Sg1	0.106	0.104	0.104	0.082	0.113	0.115	0.113	0.113	0.132	0.128	0.128	0.124	0.117	0.104	0.082	0.084	0.107	0.106	0.107	0.109							
Sg2	0.108	0.106	0.106	0.084	0.115	0.117	0.115	0.115	0.134	0.130	0.130	0.126	0.119	0.106	0.084	0.086	0.109	0.107	0.109	0.111	0.002						
Sg3	0.111	0.110	0.110	0.090	0.121	0.123	0.125	0.125	0.142	0.140	0.139	0.132	0.130	0.110	0.096	0.098	0.109	0.108	0.109	0.111	0.029	0.031					
Sg4	0.113	0.111	0.111	0.088	0.123	0.125	0.123	0.123	0.140	0.138	0.137	0.130	0.132	0.111	0.095	0.096	0.111	0.109	0.111	0.113	0.028	0.029	0.002				
Ss1	0.065	0.064	0.067	0.079	0.123	0.113	0.102	0.104	0.134	0.120	0.120	0.115	0.123	0.111	0.102	0.104	0.107	0.106	0.104	0.109	0.095	0.097	0.108	0.106			
Ss2	0.067	0.065	0.069	0.081	0.121	0.111	0.104	0.105	0.132	0.118	0.118	0.117	0.124	0.113	0.104	0.105	0.106	0.104	0.102	0.107	0.093	0.095	0.106	0.104	0.002		

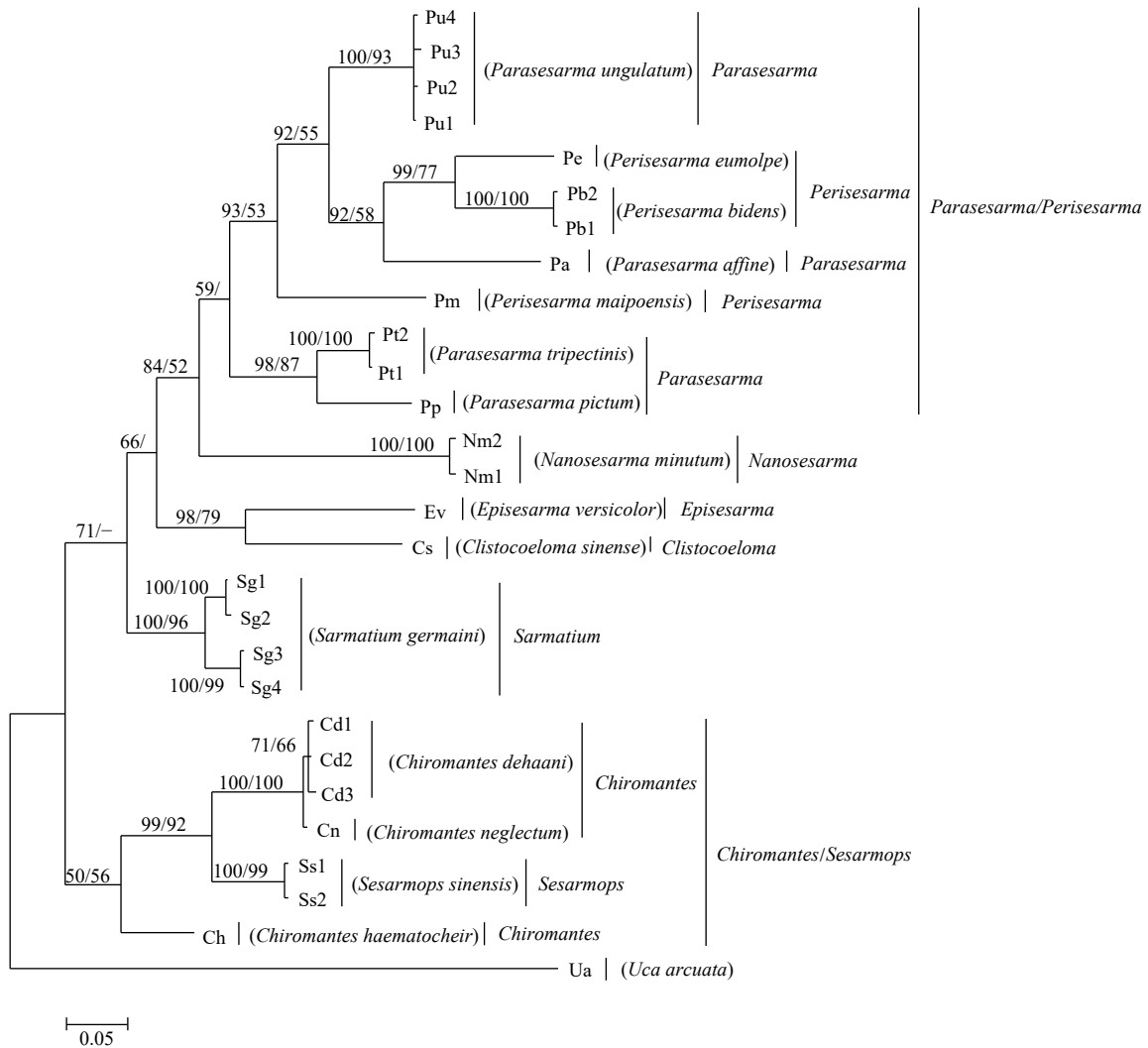


图 1 基于相手蟹及外群弧边招潮 COI 基因构建的贝叶斯分析方法 (BI) 和最大似然法 (ML) 系统树

Fig. 1 Inferred phylogenetic relationships based on nucleotide sequence of mitochondrial COI gene of Sesarmidae species using Bayesian (BI) and maximum likelihood method (ML) analyses. *U. arcuata* is used as the outgroup

BI/ML 的值分别标在相应的分支上, 值支持率小于 50% 的不显示, “-”表示分支不存在

The value of BI/ML is marked on the corresponding branch. If the support rate is less than 50%, it will not be displayed. “-” means that the branch does not exist

相手蟹^[6]。类似结果也存在于其他蟹类如天津厚蟹与侧足厚蟹的相关研究中^[24]。

4.3 属间关系分析

本研究的 14 种相手蟹隶属于现行分类系统相手蟹科中的 8 个属^[1, 3], 系统发育树的拓扑结构显示这 14 种相手蟹之间的系统关系大致与相手蟹科的现行分类系统相符, 但也存在需要进一步阐释的问题(图 1, 图 2)。

首先, 4 种拟相手蟹 (*Parasesarma*) 和 3 种近相手蟹 (*Perisesarma*) 分属于两个属的蟹类, 却没有分别形成 2 个独立的支系, 而是混合聚成了 1 个支系; 4 种拟相手蟹中, 斑点拟相手蟹和三栉拟相手蟹聚成一支且置信度高, 表明二者亲缘关系最近(二者 COI 序列的

遗传差异为最小值的 5.7% 或 5.8%), 与另外 2 种拟相手蟹的亲缘关系较远, 这与基于 16S rRNA 的研究结果^[5]一致; 3 种近相手蟹中, 双齿近相手蟹与 *P. eumolpe* 聚成 1 支且置信度较高, 表明二者亲缘关系较近, 但与米埔相手蟹的亲缘关系较远(图 1, 图 2)。此类情况即多种拟相手蟹和近相手蟹紧密的聚类在一起, 导致相关种属的重新调整和新属的建立^[13]已见于国外的相手蟹类; 基于此, 中国的拟相手蟹属和近相手蟹属的蟹类是否需要合并为 1 个复合类群 (*Parasesarma/Perisesarma*), 或者 2 个属所属的种类是否需要重新厘定, 或者是否需要建立新属, 尚需对该两属更多种类在形态、分子等方面进行更深入全面的研究来确认。

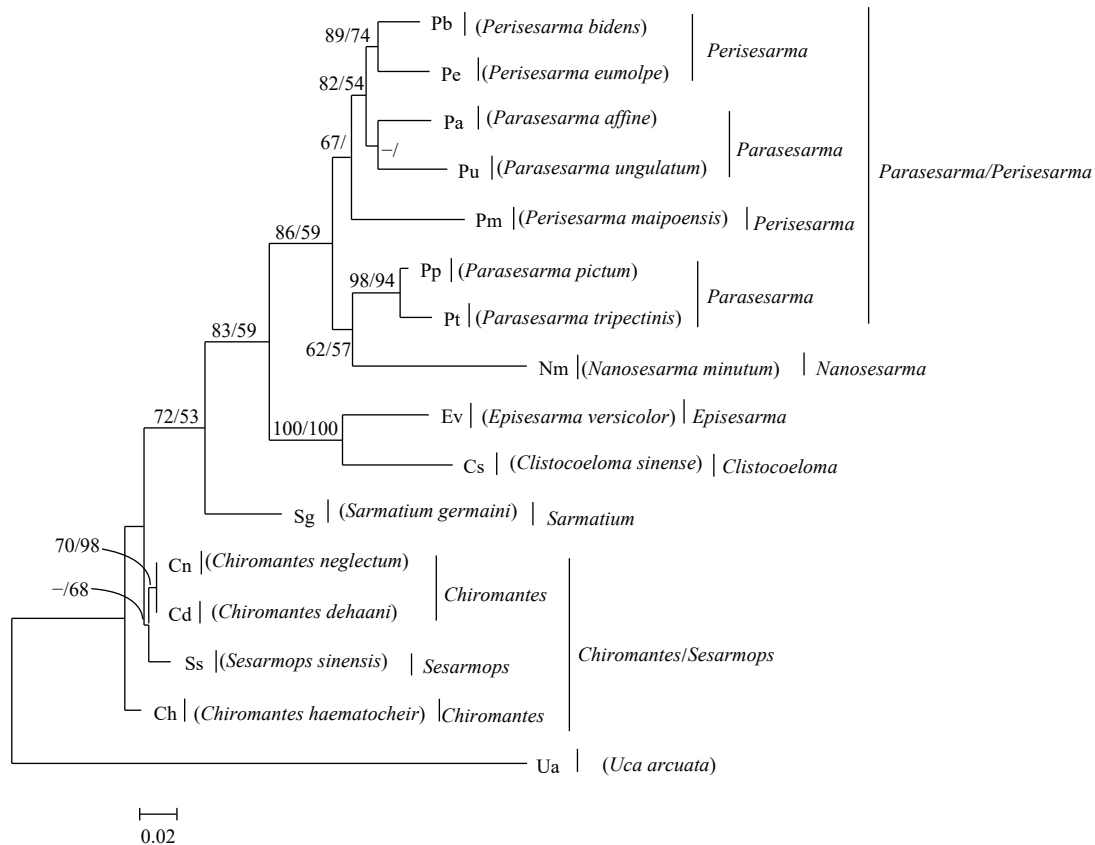


图2 基于相手蟹及外群弧边招潮 16S rRNA 基因构建的贝叶斯分析方法(BI)和最大似然法(ML)系统树

Fig. 2 Inferred phylogenetic relationships based on nucleotide sequence of mitochondrial 16S rRNA gene of Sesarmidae species using Bayesian (BI) and maximum likelihood method (ML) analyses. *U. arcuata* is used as the outgroup

BI/ML 的值分别标在相应的分支上, 值支持率小于 50% 的不显示, “-”表示分支不存在

The value of BI/ML is marked on the corresponding branch. If the support rate is less than 50%, it will not be displayed. “-” means that the branch does not exist

此外, 无齿螳臂相手蟹首先与中华中相手蟹聚成一支, 表明二者的亲缘关系较近, 然后再与红螳臂相手蟹聚为一大支(图 1, 图 2); 这与现行分类系统中, 中华中相手蟹属于中相手蟹属(*Sesarmops*), 其他两种属于螳臂相手蟹属(*Chiromantes*)不一致, 建议将此两个属合并(*Chiromantes/Sesarmops*)或者将中华中相手蟹移入螳臂相手蟹属或把无齿螳臂相手蟹移入中相手蟹属, 但这有待于对中相手蟹属中其他种类进

行更深入的相关研究才能厘定。

总之, 14 种相手蟹错综复杂的分子系统关系预示着相手蟹类为多系起源, 但由于很多种类在形态上有很高的相似度, 致使某些相手蟹种类之间的区分难度较大, 且国内在其形态、分子方面的相关研究还很少, 致使它们的种类、属间关系等存在诸多问题, 尚需针对更多种类做更广泛更深入的研究。

参考文献:

- [1] Ng P K L, Guinot D, Davie P J F. Systema Brachyurorum: part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world[J]. The Raffles Bulletin of Zoology, 2008, 17: 1-286.
- [2] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 1986: 482-512.
Dai Aiyun, Yang Siliang, Song Yuzhi, et al. Crabs of the China Seas[M]. Beijing: China Ocean Press, 1986: 482-512.
- [3] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 801-802.
Liu Ruiyu. Checklist of Marine Biota of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008: 801-802.
- [4] 杨明柳, 徐敬明, 吴斌, 等. 北部湾红树林蟹类多样性初步研究[J]. 四川动物, 2014, 33(3): 347-352, 357.
Yang Mingliu, Xu Jingming, Wu Bin, et al. A preliminary study on crabs diversity for Beibu Gulf mangrove[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2014, 33(3): 347-352, 357.
- [5] 杨明柳, 徐敬明, 吴斌, 等. 基于形态和 16S rRNA 基因的拟相手蟹分类研究[J]. 海洋学报, 2016, 38(8): 62-71.

- Yang Mingliu, Xu Jingming, Wu Bin, et al. Taxonomic study on the genus *Parasesarma* based on the morphology characteristics and mtDNA 16S rRNA gene[J]. *Haiyang Xuebao*, 2016, 38(8): 62–71.
- [6] 梁晓莉. 长江河口大型底栖动物疑难种修订及河口种形成机理初探[D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
- Liang Xiaoli. Revision of doubtful macrobenthic species and the preliminary study of formation mechanism of estuarine species in the Yangtze Estuary[D]. Shanghai: East China Normal University, 2017.
- [7] Moritz C, Dowling T E, Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18: 269–292.
- [8] 徐敬明. 蟹类线粒体DNA的研究与应用[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(6): 879–884.
- Xu Jingming. Study and application of mitochondrial DNA in crabs[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(6): 879–884.
- [9] Schubart C D, Diesel R, Hedges S B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs[J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 363–365.
- [10] Harrison J S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinxia* (Decapoda: Pinnotheridae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30(3): 743–754.
- [11] 徐敬明, 方华华, 高天翔. 两种相手蟹线粒体COI基因序列的比较研究[J]. *海洋通报*, 2007, 26(6): 26–31.
- Xu Jingming, Fang Huahua, Gao Tianxiang. Sequence comparison of the mitochondrial COI gene between two sesarma species[J]. *Marine Science Bulletin*, 2007, 26(6): 26–31.
- [12] Xin Zhaozhe, Liu Yu, Tang Boping, et al. A comprehensive phylogenetic analysis of Grapsoidea crabs (Decapoda: Brachyura) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) genes[J]. *Turkish Journal of Zoology*, 2018, 42(1): 46–52.
- [13] Shahdadi A, Schubart C D. Taxonomic review of *Perisesarma* (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) and closely related genera based on morphology and molecular phylogenetics: new classification, two new genera and the questionable phylogenetic value of the epibranchial tooth[J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2018, 182(3): 517–548.
- [14] Davie P J F, Pabriks L. A new species of *Parasesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesarmidae) from the mangroves of Western Australia[J]. *Zootaxa*, 2010, 2564(1): 62–68.
- [15] Koller P, Liu H, Schubart C D. A new semiterrestrial species of *Parasesarma* De Man, 1895, from Taiwan (Decapoda, Brachyura, Sesarmidae)[M]//Fransen C H J M, De Grave S, Ng P K L. Studies on Malacostraca: Lipke Bijdeley Holthuis Memorial Volume. Crustaceana Monographs. Boston: Brill, 2010: 357–368.
- [16] Rahayu D L, Ng P K L. Two new species of *Parasesarma* De Man, 1895, from Southeast Asia (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarmidae)[J]. *Zootaxa*, 2009, 1980: 29–40.
- [17] Naderloo R, Schubart C D. Description of a new species of *Parasesarma* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) from the Persian Gulf, based on morphological and genetic characteristics[J]. *Zoologischer Anzeiger: A Journal of Comparative Zoology*, 2010, 249(1): 33–43.
- [18] Rahayu D L, Ng P K L. Revision of the *Parasesarma plicatum* (Latreille, 1803) species-group (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarmidae)[J]. *Zootaxa*, 2010, 2327(1): 1–22.
- [19] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294–299.
- [20] Palumbi S R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1994, 25: 547–572.
- [21] Miller M A, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees[C]//Proceedings of 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA: IEEE, 2010: 1–8.
- [22] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [23] Shih H T, Suzuki H. Taxonomy, phylogeny, and biogeography of the endemic mudflat crab *Helice/Chasmagnathus* complex (Crustacea: Brachyura: Varunidae) from East Asia[J]. *Zoological Studies*, 2008, 47(1): 114–125.
- [24] 徐敬明. 厚蟹遗传多样性与分类地位的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Xu Jingming. Studies on genetic diversity and taxonomic status of the crab genus *Helice*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.
- [25] Xing Yuhui, Ma Xiaoping, Wei Yuqing, et al. The complete mitochondrial genome of the semiterrestrial crab, *Chiromantes neglectum* (Eubrachyura: Grapsoidea: Sesarmidae)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2016, 1(1): 461–463.
- [26] Schubart C D, Koller P. Genetic diversity of freshwater crabs (Brachyura: Sesarmidae) from central Jamaica with description of a new species[J]. *Journal of Natural History*, 2005, 39(6): 469–481.
- [27] Liu Xue, Yuan Yiming, He Yanlong, et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Sesarma dehaani* with phylogenetic analysis[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4(1): 350–351.
- [28] Kawane M, Wada K, Watanabe K. Comparisons of genetic population structures in four intertidal brachyuran species of contrasting habitat characteristics[J]. *Marine Biology*, 2008, 156(2): 193–203.
- [29] Komai T, Ng P K L. A new species of sesarmid crab of the genus *Chiromantes* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) from the Ogasawara Islands, Japan[J]. *Zootaxa*, 2013, 3681(5): 539–551.

Molecular phylogeny of the sesarmid crab based on the partial sequences of mitochondrial COI and 16S rRNA genes from the coast of China

Xu Yan^{1,2}, Pan Hongping¹, Yan Bing², Gao Tingwei², Wu Bin², Yang Mingliu²

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Key Lab of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Mangrove Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Beihai 536000, China)

Abstract: The species in the family of Sesarmidae are among the species mostly difficult to be differentiated taxonomically in the Superfamily Grapsoidea because of their morphological similarity. The analysis of partial sequences of mitochondrial COI gene and 16S rRNA gene of 14 species in 8 genera of Sesarmidae for their molecular phylogenetics reveals that the percentages of sequence divergences of 14 species of Sesarmidae are from 5.7% to 14.5% and from 1.5% to 12.1%, both indicating that the species difference are significant. The phylogenetic trees show that the 14 species are separate and valid species and 4 species of *Parasesarma* and 3 species of *Perisesarma* are not 2 independent clades but clustered into 1 clade. *Chiromantes dehaani* and *Sesarmops sinensis* are clustered into one clade and then clustered with *C. haematocheir* into another clade, inconsistent with their morphological classification. The complicated molecular phylogenetic relationship among the species of Sesarmidae suggests that the species in the family of Sesarmidae might have polyphyletic origin, and their interspecific relationship or inter-genus relationship need to be clarified.

Key words: Sesarmidae; mitochondrial DNA; COI gene; 16S rRNA gene; phylogeny